

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-078971
(43)Date of publication of application : 21.03.2000

(51)Int.Cl. C12N 9/10
C12N 1/20
C12P 21/02
// (C12N 9/10
C12R 1:07)
(C12N 1/20
C12R 1:07)
(C12P 21/02
C12R 1:07)

(21)Application number : 10-251650

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD
SUGIHARA AKIO

(22)Date of filing : 04.09.1998

(72)Inventor : SUGIHARA AKIO
TOMINAGA YOSHIO
TAKENISHI SHIGEYUKI
SHIMADA YUJI
MURO TETSUO
NAGAO HISAHIO
WATANABE YOSHI

(54) NEW ENZYME FOR SYNTHESIZING OLIGOPEPTIDE FROM D- OR L- AMINOACID ESTER AND MICROORGANISM PRODUCING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new enzyme catalyzing oligopeptide synthetic reaction using an amino acid ester and an amine component as substrates, capable of utilizing either of D- and L-amino acid esters and useful for synthesis etc., for medicines.

SOLUTION: This new enzyme catalyzes synthetic reaction of oligopeptide using an amino acid ester and an amine component as substrates and can utilize either of D-amino acid ester and L-amino acid ester as the amino acid ester and is useful for synthesis, etc., of oligopeptide capable of using for antibiotics and hormones widely utilized in medicinal field. The new enzyme is obtained by culturing a microorganism producing the enzyme [e.g. Bacillus mycoides AS-1] (FERM D-16969)].

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-78971

(P2000-78971A)

(43)公開日 平成12年3月21日(2000.3.21)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターコード(参考)
C 1 2 N 9/10		C 1 2 N 9/10	4 B 0 5 0
	1/20	1/20	A 4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	B 4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 9/10			
C 1 2 R 1:07)			

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-251650

(22)出願日 平成10年9月4日(1998.9.4)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年4月2日
 社団法人日本農芸化学会開催の「日本農芸化学会1998年
 度大会」において文書をもって発表

(71)出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(71)出願人 592151764

杉原 耿雄

兵庫県伊丹市千僧6-87

(72)発明者 杉原 耿雄

兵庫県伊丹市千僧6丁目87番地

(72)発明者 富永 嘉男

大阪府大阪市西淀川区歌島2丁目7番2号

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 D-、L-アミノ酸エステルよりオリゴペプチドを合成する新規酵素およびこれを生産する微生物

(57)【要約】

【課題】 医薬分野で広く利用されている抗生物質およびホルモン類に使用され得るオリゴペプチドを合成する酵素、その酵素を生産する微生物、およびその酵素または微生物を用いるオリゴペプチド合成方法を提供すること。

【解決手段】 D-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸エステルのいずれをも基質としてオリゴペプチド合成反応を触媒する新規酵素およびこの酵素を生産する微生物、およびこの酵素または微生物を用いるオリゴペプチド合成方法。微生物は、好ましくはバチルス ミコイデス (*Bacillus mycooides*) である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アミノ酸エステルとアミン成分とを基質とするオリゴペプチド合成反応を触媒する酵素であって、該アミノ酸エステルとして、D-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸エステルのいずれをも利用し得る、酵素。

【請求項 2】 前記アミン成分として、D-アミノ酸およびL-アミノ酸のいずれをも利用し得る、請求項 1 に記載の酵素。

【請求項 3】 プロテアーゼ活性、ペプチダーゼ活性、およびエステラーゼ活性のいずれをも有しない、請求項 1 または 2 に記載の酵素。

【請求項 4】 pH が 4～9 の範囲でオリゴペプチド合成反応を触媒し、至適 pH が 6.5 ± 0.5 である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の酵素。

【請求項 5】 0～60℃の温度範囲でオリゴペプチド合成反応を触媒し、至適温度が $35 \pm 5^\circ\text{C}$ である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の酵素。

【請求項 6】 ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量が $29 \pm 3 \text{ kDa}$ である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の酵素。

【請求項 7】 請求項 1 から 6 のいずれかに記載の酵素を生産する微生物。

【請求項 8】 バチルス ミコイデス AS-1 (*Bacillus mycooides* AS-1) (生命研菌寄第 16969 号; FERM P-16969) である、請求項 7 に記載の微生物。

【請求項 9】 請求項 1 から 6 のいずれかに記載の酵素、または請求項 7 または 8 に記載の微生物をオリゴペプチド合成反応に使用する工程を包含する、オリゴペプチドの合成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、D-アミノ酸エステルもしくはL-アミノ酸エステルを基質としてオリゴペプチド合成反応を触媒する新規酵素およびこの酵素を生産する微生物、およびこの酵素または微生物を用いるオリゴペプチド合成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】これまで、D-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸エステルのいずれをも基質としてオリゴペプチド合成反応を触媒し、かつペプチド加水分解活性を示さない酵素、およびこのような酵素を生産し得る微生物は知られていなかった。本発明者らは、D-アミノ酸のみに作用してオリゴペプチド合成反応を触媒する酵素を見出し、特開平 9-173062 号公報に詳細を開示した。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、医薬分野で広く利用されている抗生物質およびホルモン類に使用さ

れ得るオリゴペプチドの合成に有用なものであり、その目的とするところは、オリゴペプチドを合成する酵素、その酵素を生産する微生物、およびその酵素または微生物を用いるオリゴペプチド合成方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、新たに単離したバチルス (*Bacillus*) 属に属する細菌から D-、またはL-アミノ酸エステルからオリゴペプチドを合成する新規酵素を単離し、これに基づいて、本発明を完成するに至った。

【0005】本発明は、アミノ酸エステルとアミン成分とを基質とするオリゴペプチド合成反応を触媒する酵素であって、該アミノ酸エステルとして、D-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸エステルのいずれをも利用し得る酵素を提供する。

【0006】本明細書において「アミノ酸エステル」とは、アミノ酸のアルキルエステルをいう。アルキルエステルは、好ましくは炭素数が 4 個以下の低級アルキルエステルであり、より好ましくはメチルエステルまたはエチルエステルであり、もっとも好ましくはメチルエステルである。他に特定されない限り「アミノ酸エステル」には、当該アミノ酸エステルを C 末端に有するオリゴペプチドも含まれる。

【0007】なお、本発明の酵素が作用する基質は、必ずしもアミノ酸エステルのみに限定されることはなく、任意の適切なカルボキシル基誘導体を有するアミノ酸もまた基質となり得る。

【0008】本明細書において「オリゴペプチド」とは、天然型L-アミノ酸および/またはD-アミノ酸、および/または非天然型アミノ酸が、任意の順序でアミド結合により縮合したものをいう。非天然型アミノ酸は、フェニルグリシン、p-ヒドロキシフェニルグリシンなどの公知化合物を含むが、これらには限定されず、例えば、アミノ酸から誘導されるアミノ基およびカルボキシル基を有する任意の化合物を含み得る。「オリゴペプチド」の重合度 (アミノ酸残基の数) は、代表的には 2～10、好ましくは 2～7、より好ましくは 2～4 であるが、これらに限定はされない。

【0009】本明細書において「アミン成分」とは、アミノ基を有する任意の化合物を指し、代表的にはD-アミノ酸またはL-アミノ酸である。他に特定されない限り、アミン成分としての「アミノ酸」には、当該アミノ酸を N 末端に有するオリゴペプチドも含まれる。

【0010】本発明の酵素 (以下「本酵素」ともいう) は次の特性により特定され得る。

(1) D-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸エステルのいずれに対しても作用して、オリゴペプチド合成反応を触媒する。

(2) オリゴペプチド合成反応の基質であるアミン成分は、D-アミノ酸およびL-アミノ酸のいずれであってもよい。

(3) プロテアーゼ活性、ペプチダーゼ活性、およびエステラーゼ活性のいずれをも有しない。

(4) 反応液の pH が 4~9 の範囲で活性を有し、特に pH が 6~7 の範囲で活性が高く、至適 pH は 6.5 ± 0.5 である。

(5) 0~60℃ の反応温度で活性を示し、特に反応温度が 30~40℃ の範囲で活性が高く、至適温度は 35 ± 5℃ である。

(6) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量が 29 ± 3 kDa である。

【0011】本酵素は、少なくとも上記(1)の特性を有し、好ましくは上記(1)および(2)の特性を有する。本酵素は、上記(1)に加えて、上記(2)から

(6)までの特性の少なくとも1つを有し得、またはこれらの2つ以上を組み合わせて有し得る。最も好ましくは、本酵素は上記(1)から(6)までの特性の全てを有する。

【0012】なお、本明細書において、プロテアーゼ活性を有しないとは、30℃に保温した0.6%ミルクカゼイン溶液(pH 7.2)に、当該酵素を加えて、10分間インキュベートしたとき、プロテアーゼ反応の進行が検出し得ないことをいう。ペプチダーゼ活性を有しないとは、0.02MのD-フェニルアラニン-D-フェニルアラニン(D-Phe-D-Phe)、D-Phe-L-Phe、L-Phe-D-Phe、およびL-Phe-L-Pheをそれぞれ含む、pH 6.5の0.1Mリン酸緩衝液に、当該酵素を加えて、30℃で、5時間放置したとき、4種類のいずれのペプチドについても、検出し得る遊離のフェニルアラニンを生成しないことをいう。エステラーゼ活性を有しないとは、0.5mlのプロピオン酸メチルまたは酪酸メチル、2mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.5)および当該酵素を含む混合溶液を25℃で30分間インキュベートしたとき、検出し得る遊離した酸を生成しないことをいう。

【0013】本酵素はまた、その極めて広い基質特異性によって特徴付けられ得る。すなわち、オリゴペプチド合成反応におけるアミノ酸エステルおよびアミン成分として、それぞれ、親水性アミノ酸(酸性アミノ酸および塩基性アミノ酸を含む)および疎水性アミノ酸のいずれをも利用し得る。

【0014】当業者には明かなように、本酵素をプロテアーゼなどで処理して、本酵素の活性を維持したより低分子量の活性フラグメントを得ることも可能である。そのような活性フラグメントおよびその利用もまた、本発明の範囲に含まれ得る。同様に、公知のタンパク質修飾技術によって本酵素に適当な修飾を施して、酵素の機能、理化学的性質などをさらに改善することも可能であ

る。そのような修飾タンパク質およびその利用もまた、本発明の範囲に含まれ得る。

【0015】本発明はまた、本酵素を生産する微生物を提供する。本発明の微生物は、好ましくは、平成10年8月28日に工業技術院生命工学工業技術研究所(生命研と略称する)に寄託したバチルス ミコイデス AS-1 (*Bacillus mycoides* AS-1) (生命研菌寄第16969号; FERM P-16969) である。

【0016】本発明の微生物には、上記バチルス ミコイデス株と分類学上近縁の微生物(代表的には同一の属、好ましくは同一または近縁の種)であって、本酵素を生産し得る微生物も含まれ得る。そのような微生物は、例えば、上記(1)の特性を基準としたスクリーニングによって得ることができる。

【0017】上記特性を有するD-あるいはL-アミノ酸オリゴペプチド合成酵素およびこれを生産する微生物はこれまで知られていない。

【0018】本発明はまた、本酵素または本酵素を生産する微生物をオリゴペプチド合成反応に使用する工程を含むオリゴペプチドの合成方法を提供する。

【0019】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0020】本発明の酵素は、生産菌は限定されるものではないが例えば、バチルス ミコイデス AS-1 (*Bacillus mycoides* AS-1) (生命研菌寄第16969号; FERM P-16969) により生産される。この微生物は本発明者らが、土壌から、アミノ酸エステルを基質としてオリゴペプチド合成反応を触媒する酵素の生産菌をスクリーニングした結果、分離された微生物である。以下、この微生物の性状について述べる。

【0021】(1) 形態および培養

本微生物は、脂肪酸定量量その他の同定試験の結果から、乾燥その他のストレスに抵抗性のある内生孢子を形成する枯草菌バチルス ミコイデス (*Bacillus mycoides*) に属することが示された。

【0022】次に、本微生物から本発明の酵素を生産するための条件について説明する。本微生物は液体培養により当該酵素を生産し得る。本細菌を生育させる培地としては特に限定されず、通常の液体培地が用いられる。炭素源としてはグルコースが用いられ得る。窒素源としてはペプトン、肉エキスを利用し得る。これらの培地成分は本細菌の生育を阻害しない濃度であればよく、炭素源は通常0.5%~5重量%、好ましくは1~3重量%、窒素源は通常1~5%、好ましくは1~2重量%である。培地は、通常pHを6~8に調整し、滅菌して使用する。培養温度は本細菌が生育し得る温度であればよく、通常20~35℃、好ましくは25~30℃である。本細菌を液体培養する場合は、通気培養または振と

う培養が好ましい。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通気培養または振とう培養の場合は通常3～5日間が好ましい。

【0023】(2) 培養液からの本酵素の分離精製
本細菌の培養液から本発明の酵素を分離精製するには、既知の精製法、例えば脱塩、透析、塩析、各種クロマトグラフィー、電気泳動が単独もしくは併用して利用され得る。

【0024】培養後、菌体などの不溶物を遠心分離、または濾紙または濾布などによる濾過などにより除去し、本酵素を含む粗酵素液を回収する。硫酸による分画(塩析)、透析、各種クロマトグラフィーなどの一般に用いられる酵素の精製法により、得られた粗酵素液から本酵素が精製され得る。例えば、上記粗酵素液を塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、疎水クロマトグラフィーに順次供することにより、精製された高活性の本酵素を含む画分が得られる。

【0025】(3) 本酵素の活性の測定
本発明の酵素の活性は、例えば、0.4MのD-フェニルアラニンメチルエステル(D-PheOMe)を基質として用い、50mMリン酸緩衝液中、30℃で5時間反応させることにより測定し得る。反応生成物は、反応液をシリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)によって分析することにより確認し得る。

【0026】本酵素の活性は、D-PheOMeを基質として用い、1時間に1μmolのD-Phe-D-PheOMeを生成する酵素量を、1単位(U; ユニット)と定義した。

【0027】(4) 酵素反応物の同定
酵素反応(オリゴペプチド合成反応)による生成物は、例えば、逆相カラムを用いる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)での分取後、アミノ酸分析および/または質量分析に付すことにより同定し得る。従って、当業者は、所望のオリゴペプチド生成物を得るための適切な反応条件(基質の比率および濃度、反応時間など)を容易に設定し得る。

【0028】以下の実施例にて、本発明をさらに詳細に説明するが、これらはなんら本発明を限定するものではない。

【0029】

【実施例】実施例において、培地成分、アミノ酸、およびその他の試薬は、いずれも市販品を使用した。TLCでは、反応液約1μlをシリカゲル薄層プレート(メルク社製)にスポットし、n-ブタノール:酢酸:水(4:1:1)混合液で展開し、ニンヒドリン試薬を噴霧した後、約120℃で、5分間加熱して発色させた。逆相HPLCには島津製LC-9Aを、アミノ酸分析には島津製ALC-1000を、そして質量分析には日本電子JMS-DX303H(FAB-MS分析)を、それぞれ使用した。

【0030】(実施例1) パチルス ミコイデスの培養
100mlのブイヨン培地(2%ポリペプトン、1%肉エキス、0.3%食塩、pH7.0)を含む500mlの振とうフラスコに、本細菌(*Bacillus mycoides* AS-1(生命研菌寄第16969号; FERM P-16969))を接種し、28℃で、4日間振とう培養した。

【0031】(実施例2) 本酵素の精製

実施例1で得られた培養液を遠心分離(10,000rpm、10分間)して得られた上清を粗酵素液とした。この粗酵素液に80%飽和となるように硫酸(硫酸アンモニウム)を添加し、生じた沈殿を10mMリン酸緩衝液(pH6.0)に溶解し、同緩衝液に対して透析した。この透析液を同緩衝液で平衡化したDEAE-トヨパール650Mカラム(東ソー社製)にアブライシ、同緩衝液で洗浄後、0Mから1Mまでの食塩(NaCl)の濃度勾配をかけて、カラムに吸着された本酵素を溶出した。活性画分を集めて限外濾過膜を用いて濃縮した。この濃縮物を、Sephacryl S-100(ファルマシア社製)カラムを用いて、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)を含む0.2M NaCl水溶液を溶離液として、ゲル濾過に付した。活性画分を集めて限外濾過膜を用いて濃縮後、終濃度が20%飽和となるよう硫酸を添加した。この酵素液を20%飽和の硫酸で平衡化したブチルトヨパール650Mカラム(東ソー社製)にアブライシ、20%飽和から0%飽和までの硫酸濃度勾配をかけて、カラムに吸着された本酵素を溶出し、精製された酵素を得た。上記の精製工程全体を通じての、活性酵素の回収率は8%、精製度は約200倍であった。

【0032】(実施例3) 本酵素の分子量測定
実施例2で得られた精製酵素の分子量は、Superdex 200 HR10/30カラム(1×30cm)(ファルマシア社製)を用いるゲル濾過により測定した。分子量既知の標準蛋白質としてファルマシア社製アルドラーゼ(150kD)、牛血清アルブミン(68kD)、オボアルブミン(45kD)、カルボニックアンヒドラーゼ(32kD)およびリゾチーム(14.5kD)を用いて検量線を作成した。その結果、本酵素の分子量は29±3kDaであった。

【0033】(実施例4) 本酵素の酵素活性のpH依存性
酵素活性のpH依存性は、ブリットン-ロビンソン(Britton-Robinson)の広域緩衝液を用いて30℃で測定した。基質として0.02Mのアセチル-D-フェニルアラニンメチルエステルと0.2MのL-ロイシニアミドとを用い、ジペプチドであるアセチル-D-フェニルアラニン-L-ロイシニアミドの生成量を逆相HPLCで測定した。その結果、少なくともpH4～9の範囲では活性が認められ、最適pHは6.5±0.5であった。本酵素のpH特性を図1に示す。

【0034】(実施例5) 本酵素の酵素活性の温度依存性

酵素活性の温度依存性は、0.2MのD-フェニルアラニンメチルエステルを基質としてpH6.5の50mMリン酸緩衝液中、0~60℃の温度範囲で5時間作用させて測定した。その結果、この温度範囲全体にわたって活性が認められ、最適温度は35±5℃であった。本酵素の温度特性を図2に示す。

【0035】(実施例6) 本酵素のプロテアーゼ活性
30℃に保温した0.6%ミルクカゼイン溶液(pH7.2)2mlに、本酵素の酵素液0.4ml(30U)を加えて、10分間インキュベートした後、トリクロロ酢酸溶液2mlを加えて、10分間放置した。混合物を濾紙で濾過した後、濾液の275nmでの吸光度を測定することにより、プロテアーゼ反応の有無を調べた。その結果、本酵素には検出し得るプロテアーゼ活性のないことが示された。

【0036】(実施例7) 本酵素のペプチダーゼ活性
0.02MのD-フェニルアラニン-D-フェニルアラニン(D-Phe-D-Phe)、D-Phe-L-Phe、L-Phe-D-Phe、およびL-Phe-L-Pheをそれぞれ含む、pH6.5の0.1Mリン酸緩衝液に、本酵素の酵素液0.1mlを加えた後、30℃で、5時間放置した。アミノ酸分析計でフェニルアラニンの生成量を調べた。その結果、本酵素は、上記4種類のいずれのペプチドについても遊離のフェニルアラニンを生成せず、検出し得るペプチダーゼ活性のないことが示された。

【0037】(実施例8) 本酵素のエステラーゼ活性
0.5mlのプロピオン酸メチルまたは酪酸メチル、2mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH6.5)および本酵素の酵素液0.1mlを含む混合溶液を25℃で30分間インキュベートした後、20mlのエタノールを加え、0.05Nの水酸化カリウムで遊離した酸を滴定した。その結果、本酵素は、上記2種類のいずれのエステルについても遊離の酸を生成せず、検出し得るエステラーゼ活性のないことが確認された。

【0038】(実施例9) 本酵素の基質特異性
実施例2で精製された本酵素を種々の0.2MのD-アミノ酸メチルエステルに30℃、pH6.5で5時間作用させ、その反応液をシリカゲルTLCおよび逆相HPLCに供した。TLC分析の結果を図3に示す。図3の下欄は、アミノ酸の種類を通常の1文字記号で示す。R(NO₂)はニトロアルギニンである。本酵素が、極めて広い基質特異性を示すことが理解される。

【0039】D-フェニルアラニンメチルエステル(D-PheOMe)を基質とした場合の、出発物および5時間後の反応液の逆相HPLCのクロマトグラムを図4に示す。逆相カラムとしてケムコソルブ(ケムコ社製)を用い、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含む1

0%から70%までのアセトニトリルの濃度勾配により溶出した。反応生成物は、アミノ酸分析および質量分析により、D-フェニルアラニンのオリゴペプチド(重合度2~6)であることが確認された。

【0040】上記と同様に、本酵素を種々のL-アミノ酸メチルエステルに作用させた場合のシリカゲルTLC分析の結果を図5に示す。図3および図5の結果から、本酵素はD-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸エステルのいずれをも基質としてオリゴペプチド合成反応を触媒し得ることが理解される。

【0041】(実施例10) 本酵素を用いる用いるオリゴペプチド合成

実施例2で精製された本酵素(40U)を、0.02Mのアセチル-D-フェニルアラニンメチルエステル(Ac-D-PheOMe)と0.2MのL-ロイシニアミド(L-LeuNH₂)とを含む水溶液(pH6.5)に、30℃で5時間作用させた。反応生成物を、逆相HPLCで分取した。逆相カラムとしてケムコソルブ(ケムコ社製)を用い、実施例9と同じ条件で溶出した。逆相HPLCのクロマトグラムを図6に示す。分取した生成物を質量分析に供することにより、生成物がアセチル-D-フェニルアラニン-L-ロイシニアミド(Ac-D-Phe-L-LeuNH₂)であることが確認された。質量スペクトルを図7に示す。

【0042】

【発明の効果】本発明によれば、種々のアミノ酸オリゴペプチドを合成する酵素、およびこの酵素を生産する微生物が提供される。そのため、本酵素は、医療分野で広く利用されているペプチド性抗生物質、ホルモンなどの製造に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本酵素のpH特性を示す。

【図2】 本酵素の温度特性を示す

【図3】 本酵素を0.2Mの各種D-アミノ酸メチルエステルと、pH6.5、30℃で5時間インキュベートした後のシリカゲル薄層クロマトグラムを示す。

【図4】 本酵素を0.2MのD-フェニルアラニンメチルエステルと、pH6.5、30℃で5時間インキュベートした場合の(a)出発物および(b)5時間後の反応液の逆相高速液体クロマトグラムを示す。

【図5】 本酵素を0.2Mの各種L-アミノ酸メチルエステルと、pH6.5、30℃で5時間インキュベートした後のシリカゲル薄層クロマトグラムを示す。

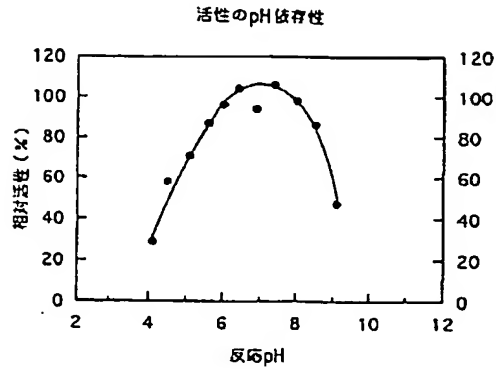
【図6】 本酵素を0.02Mのアセチル-D-フェニルアラニンメチルエステルと0.2MのL-ロイシニアミドとを含む水溶液(pH6.5)に、30℃で5時間作用させた後の反応液の逆相高速液体クロマトグラムを示す。

【図7】 本酵素を0.02Mのアセチル-D-フェニルアラニンメチルエステルと0.2MのL-ロイシニア

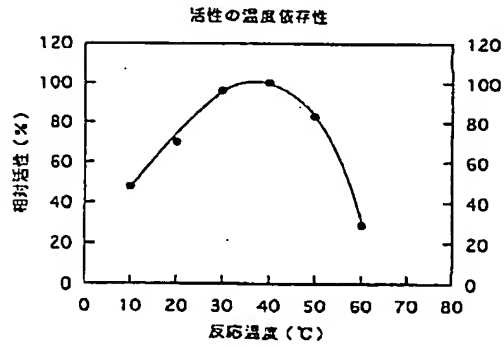
ミドとを含む水溶液 (pH 6.5) に、30℃で5時間

作用させた後の生成物の質量スペクトルを示す。

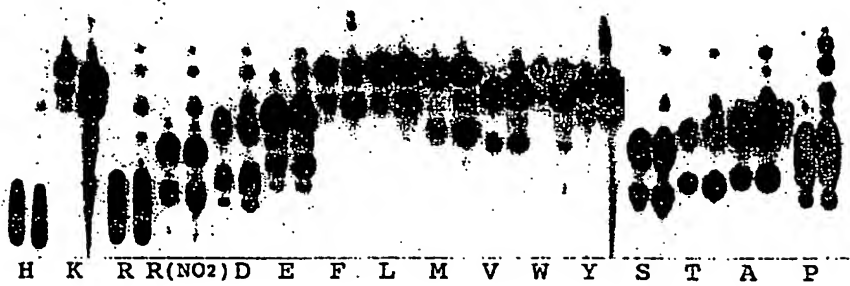
【図1】



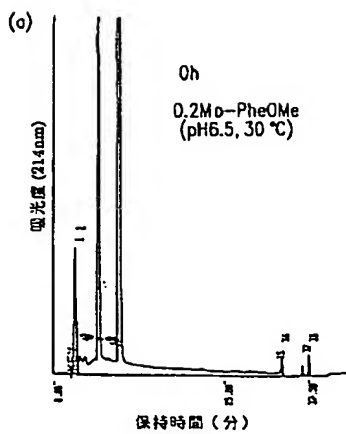
【図2】



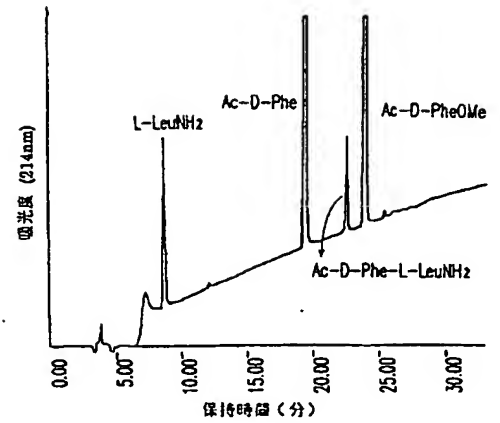
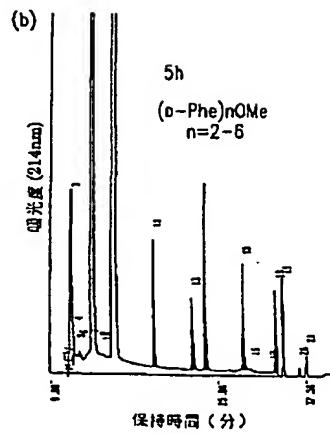
【図3】



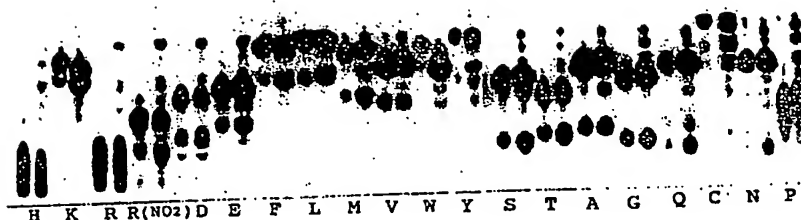
【図4】



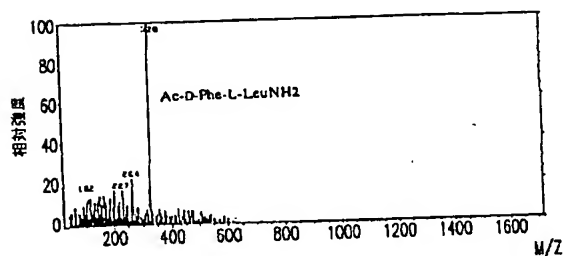
【図6】



【図5】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

(C 1 2 N 1/20)

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 P 21/02)

C 1 2 R 1:07)

(72) 発明者 竹西 繁行
 奈良県奈良市神功1丁目6番地平城第1団
 地19-302

(72) 発明者 島田 裕司
 大阪府大阪市東住吉区北田辺4丁目6番13
 号

(72) 発明者 室 哲雄
 京都府宇治市五ヶ庄西川原32番地の8 ヌ
 ニライフ宇治A棟 310号

(72) 発明者 永尾 寿浩
 大阪府大阪市生野区生野西4丁目18番6号

(72) 発明者 渡辺 嘉
 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目7番809
 号

F ターム (参考) 4B050 CC01 DD02 FF03E FF04E
 FF05E FF11E FF12E LL01
 LL05

4B064 AG01 CA02 CA21 CB30 CD13
 CE03 CE04 CE06 CE07 CE10
 CE11 DA01 DA16

4B065 AA15X AC14 AC15 BB01
 BC01 BC03 BC26 BD14 BD15
 BD17 BD18 BD33 BD50 CA27
 CA29 CA44